

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 89–91

Vergleich von Aminosäuren in menschlichem Serum und Plasma

Von N. R. Katz und M. Keck

Abteilung Innere Medizin IV (Komm. Direktor: Prof. Dr. R. Kluthe) der Universität Freiburg

(Eingegangen am 10. August/14. Oktober 1976)

Zusammenfassung: Unter standardisierten Bedingungen werden die Aminosäuren in Serum und Plasma bestimmt und miteinander verglichen. Nach unmittelbar im Anschluß an die Blutabnahme erfolgter Probenvorbereitung sind die untersuchten Aminosäurekonzentrationen in Serum und Plasma gleich. Findet die Enteiweißung allerdings erst nach 10 oder 24-stündigem Stehen des Serums bei 4 °C oder 22 °C statt, sind verschiedene Aminosäurekonzentrationen gegenüber den Ausgangswerten signifikant verändert.

Comparison of amino acids in human serum and plasma

Summary: Using standardized analytical methods amino acids in human serum and plasma were compared. Identical concentrations of the studied amino acids are found in serum and plasma, which are prepared immediately after blood sampling. If protein precipitation is performed after storage of the serum sample at 4 °C or 22 °C for 10 or 24 hours, concentrations of some amino acids are significantly changed.

Einleitung

In Untersuchungen über das Verhalten von Aminosäuren im Blut werden entsprechende Konzentrationsangaben bevorzugt für Plasma und nur vereinzelt für Serum angegeben. Da die Mehrzahl aller klinisch-chemischen Laboruntersuchungen des Blutes jedoch im Serum vorgenommen werden, erscheint es wünschenswert, auch die Aminosäurebestimmung im Serum vorzunehmen. Wie sich im Rahmen einer Untersuchung an Heimdialysepatienten zeigte (1, 2) ist dies besonders dort von Vorteil, wo Blutabnahme und das Abtrennen von zellulären Blutbestandteilen außerhalb der Klinik erfolgen. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Serum- und Plasmaamino-säuren liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor (3–6). Dies scheint im wesentlichen auf unterschiedliche Versuchs- und Analysebedingungen zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Serum- und Plasmaamino-säuren nach exakt standardisierter Aufarbeitung des jeweiligen Untersuchungsmaterials miteinander verglichen. Darüber hinaus wurden Veränderungen des Aminosäurespektrums in Abhängigkeit vom Intervall zwischen Serumgewinnung und Enteiweißung untersucht.

Material und Methoden

Zwölf gesunden Versuchspersonen im Alter zwischen 21 und 35 Jahren (7 Männer, 5 Frauen) wurde morgens nüchtern aus der leicht gestauten Vena cubitalis in zwei Zentrifugenröhrchen ohne bzw. mit Lithiumheparinat-Zusatz (0,75 g/l Blut) Blut abge-

nommen. Beide Proben wurden verschlossen, vorsichtig durchmischt und nach 15minütigem Stehen bei 4 °C in der Kühlzentrifuge bei 4 °C 10 Minuten mit 6000 g zentrifugiert. Der klare Serum- bzw. Plasmaüberstand wurde abpipettiert und durch Zugabe von 0,4 ml 150 g/l Sulfosalicylsäure zu 1,6 ml Serum oder Plasma unter kräftigem Umschütteln enteiweißt. Das präzipitierte Protein wurde nach einstündigem Stehen im Eis in der Kühlzentrifuge abgetrennt. Vom klaren enteiweißten Überstand wurde 1 ml entnommen und mit 0,6 ml 0,1 mol/l Lithiumcitratpuffer pH 2,2 (7) versetzt. Die so vorbereiteten Proben blieben bis zur Aminosäureanalyse bei – 30 °C eingefroren.

Von sechs Probanden wurde darüber hinaus je ein Aliquot des Serums 4, 10 und 24 Stunden bei 4 °C sowie in einer weiteren Serie entsprechend lange bei 22 °C (Raumtemperatur) vor der Enteiweißung aufbewahrt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben.

Die chromatographische Trennung der Aminosäuren wurde in einem Analysator LC 4010 (Biotronik, D-8000 München) an Ionenaustauscherharz DC 1 A (Durrum, Palo Alto/Californien) auf einer 50 × 0,9 cm Säule vorgenommen. Die Elution erfolgte mit Lithiumcitrat Puffern modifiziert nach Kedenburg (8). Das Ninhydrin-Reagenz war nach Spackman et al. (9) hergestellt. Für jede Analyse wurden 0,5 ml vorbereitete Probe entsprechend 0,25 ml nativem Serum bzw. Plasma eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgte mit Aminosäure-Standard-Gemisch (Hamilton, Californien); alle übrigen Reagenzien wurden von E. Merck, D-6100 Darmstadt bezogen.

Zur mathematischen Auswertung der photometrischen Bestimmung der getrennten Aminosäuren diente ein Integrator Autolab System I (Spectra Physics, D-6100 Darmstadt).

Ergebnis und Diskussion

Beim Vergleichen der Aminosäurekonzentrationen in Serum und Plasma, die jeweils innerhalb von 30 Minuten

nach Blutentnahme enteiweißt worden waren, zeigten sich keine über die Fehlerbreite der Bestimmungsmethode hinausgehenden Unterschiede entsprechender Aminosäurenwerte (Tab. 1). Da sich Serum im wesentlichen durch das Fehlen von Fibrinogen (2–3 g/l) von Plasma unterscheidet, ist die Konzentration gelöster Substanzen im Serum dadurch geringfügig höher als im Plasma. Unter Berücksichtigung der Genauigkeit der Bestimmungsmethode ist dieser Unterschied für Aminosäuren allerdings vernachlässigbar klein. Daher können unter den beschriebenen Versuchs- und Analysenbedingungen gewonnene Angaben der Aminosäurekonzentration in Serum und Plasma als gleichwertig angesehen werden. Gegenüber Plasma geringfügig oder deutlich erhöhte Aminosäurekonzentrationen im Serum, wie sie vor allem von *Armstrong & Stave* (6)

Tab. 1. Vergleich von Aminosäuren in Serum und Plasma. Plasmawerte in Prozent der Serumwerte. Aminosäurekonzentration im Serum = 100 % (n = 12).

	Aminosäuren im Plasma % der Serumwerte \pm s
Glycin	99,4 \pm 1,86
Alanin	99,3 \pm 3,08
Glutamin	99,2 \pm 10,81
Glutaminsäure	97,8 \pm 8,20
Asparagin	95,1 \pm 10,20
Serin	98,8 \pm 2,77
$1/2$ Cystin	99,9 \pm 7,45
Citrullin	102,6 \pm 18,20
Ornithin	99,1 \pm 7,91
Histidin	98,9 \pm 5,03
Arginin	102,3 \pm 6,90
Tyrosin	100,2 \pm 6,02
Phenylalanin	99,6 \pm 5,21
Threonin	98,6 \pm 2,32
Valin	99,6 \pm 3,28
Leucin	100,4 \pm 3,82
Isoleucin	101,9 \pm 4,36
Methionin	97,0 \pm 4,77
Lysin	98,4 \pm 4,17

beschrieben wurden, sind vermutlich auf die unterschiedliche Aufarbeitung von Plasma einerseits und Serum, das erst nach mehrstündigem Stehen enteiweißt wurde, andererseits zurückzuführen. Bei wiederholter Bestimmung desselben Serums oder Plasmas lagen die Variationskoeffizienten für die meisten Aminosäuren zwischen 1,2 % und 3 % (n = 30). Ausschließlich Aminosäuren, die mit Ninhydrin nur eine schwache Farbreaktion aufweisen (Asparagin, Prolin) oder im Serum in geringer Konzentration vorliegen (Asparaginsäure, 1- und 3-Methyl-Histidin) zeigten bei der Bestimmung eine höhere Variationsbreite. Unter Verwendung von synthetischen Aminosäure-Standard-Gemischen, in denen alle interessierenden Aminosäuren in ausgewogenem Verhältnis vorliegen (50–125 μ mol/l), wurden auch für Asparaginsäure sowie die Methyl-Histidine in Übereinstimmung mit *Held et al.* (10) Variationskoeffizienten um 2 % ermittelt.

Bei wiederholter Bestimmung von Glutamin war in Serum und Plasma gleichermaßen eine vom Alter der enteiweißten Probe abhängige Konzentrationsabnahme zu beobachten, die u. a. auf Deamidierung zurückzuführen ist und sich selbst durch Lagerung der auf pH 2,2 eingestellten Probe bei -30°C nicht vollständig verhindern läßt (6). Entsprechend war ein geringer Anstieg der Glutaminsäure und des Ammoniaks festzustellen.

Seren, die bis zur Enteiweißung vier Stunden bei 4°C gelagert wurden, wiesen mit Ausnahme der Asparaginsäure gegenüber Plasma und sofort enteiweißtem Serum keine über die Fehlerbreite der Bestimmungsmethode hinausgehende Veränderungen der Aminosäurespiegel auf. Erfolgte die Enteiweißung allerdings erst nach 10 oder 24-stündiger Lagerung der Seren bei 4°C bzw. 22°C , so waren signifikante Konzentrationsänderungen verschiedener Aminosäuren gegenüber sofort enteiweißtem Serum zu beobachten (Tab. 2). Während

Tab. 2. Abhängigkeit der Serumamino-säure-Konzentrationen von der Dauer zwischen Serumgewinnung und -enteiweißung (N = 6). Signifikante Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert ($p < 0.02$) bestanden bei den kursiv gesetzten Werten.

	Dauer zwischen Serumgewinnung und -enteiweißung bzw. Lagerungstemperatur				
	0 h/4 $^{\circ}\text{C}$	10 h/4 $^{\circ}\text{C}$	24 h/4 $^{\circ}\text{C}$	10 h/22 $^{\circ}\text{C}$	24 h/22 $^{\circ}\text{C}$
	$\bar{x} \pm s$ (μ mol/l)	$\bar{x} \pm s$ (μ mol/l)	$\bar{x} \pm s$ (μ mol/l)	$\bar{x} \pm s$ (μ mol/l)	$\bar{x} \pm s$ (μ mol/l)
Asparaginsäure	< 2	10,5 \pm 2,5	17,0 \pm 4,8	16,1 \pm 4,1	19,0 \pm 9,8
Glutaminsäure	38 \pm 10,3	43 \pm 14,3	55 \pm 12,9	79 \pm 20,1	83 \pm 19,9
Glycin	247 \pm 14,8	259 \pm 18,8	268 \pm 20,9	267 \pm 18,9	302 \pm 48,1
Alanin	352 \pm 59,2	358 \pm 60,6	369 \pm 64,1	389 \pm 89,0	420 \pm 86,2
Serin	103 \pm 20,0	111 \pm 19,1	121 \pm 21,8	132 \pm 25,6	149 \pm 29,2
Threonin	124 \pm 15,9	129 \pm 11,8	134 \pm 12,7	132 \pm 10,6	144 \pm 18,7
Valin	227 \pm 19,5	225 \pm 27,2	235 \pm 40,9	239 \pm 54,7	264 \pm 67,6
Leucin	111 \pm 18,4	107 \pm 14,7	110 \pm 21,5	119 \pm 12,6	130 \pm 40,3
Isoleucin	67 \pm 11,2	65 \pm 11,9	72 \pm 13,2	73 \pm 15,0	79 \pm 27,9
Histidin	88 \pm 18,2	92 \pm 16,4	94 \pm 19,8	93 \pm 18,7	90 \pm 15,6
Lysin	181 \pm 28,3	187 \pm 31,6	188 \pm 29,9	190 \pm 34,2	192 \pm 32,9
Arginin	84 \pm 18,8	89 \pm 21,6	94 \pm 27,0	88 \pm 24,5	95 \pm 29,1
Tyrosin	60 \pm 7,9	58 \pm 8,8	70 \pm 10,3	64 \pm 10,1	72 \pm 11,4
Phenylalanin	51 \pm 7,8	49 \pm 14,2	48 \pm 16,3	53 \pm 17,6	64 \pm 21,7
Asparagin	67 \pm 8,6	72 \pm 8,9	80 \pm 12,1	82 \pm 10,8	82 \pm 19,6
Glutamin	627 \pm 68,1	521 \pm 71,9	504 \pm 79,5	641 \pm 101,7	539 \pm 90,7
$1/2$ Cystin	85 \pm 14,1	79 \pm 13,9	74 \pm 13,9	66 \pm 14,8	62 \pm 15,4

die Mehrzahl der Aminosäuren im Serum mit zunehmendem Intervall zwischen Blutabnahme und Enteiweißung mehr oder minder deutlich anstieg, nahm der Gehalt von Cystin und Cystein im Serum bei 4 °C und deutlicher noch bei 22 °C ab. Glutamin wies bei kühler Lagerung des Serums eine Konzentrationsabnahme auf, während bei 22 °C innerhalb der ersten 10 Stunden keine signifikante Änderung auftrat und erst danach eine Erniedrigung des Glutaminspiegels zu beobachten war. Offensichtlich war hier ähnlich wie bei Asparagin eine Deamidierung durch proteolytisch bedingte Erhöhung der Aminosäure überlagert. Am stärksten imponierte die Konzentrationszunahme der Asparaginsäure, da hier wegen des niedrigen physiologischen Serumspiegels eine mäßige absolute Veränderung mit einer Vervielfachung des Ausgangswertes verbunden war. Ein entsprechendes Verhalten war in geringerem Umfang auch bei Glutaminsäure zu beobachten.

Glycin, Alanin, Serin und Threonin wiesen in der Kälte allenfalls eine leichte, bei Lagerung um 22 °C im Durchschnitt eine mäßige Konzentrationszunahme auf. Bei den essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin waren im Mittel erhöhte Serumspiegel nur nach Lagerung bei 22 °C zu beobachten.

Histidin-, Lysin- und Argininkonzentration schienen durch Aufbewahren des Serums vor der Enteiweißung nicht signifikant verändert worden zu sein.

Trotz dieser im Mittelwert teilweise unerheblichen Zu- oder Abnahmen einzelner Aminosäuren sollten Seren, die nach mehr als vierstündiger Lagerung enteiweißt wurden, möglichst nicht mehr zur Analyse der Aminosäuren verwendet werden, da lagerungsbedingte Veränderungen von Versuchsperson zu Versuchsperson teil-

weise unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Dieses unterschiedliche, individuelle Verhalten ließ sich weder mit Alter noch Geschlecht der Probanden korrelieren. Es war daher unvorhersehbar, ob ein Serum nach längerem Stehen vor der Enteiweißung geringe oder erhebliche Veränderungen der Aminosäurekonzentration aufwies.

Die Gewinnung und Aufarbeitung der Seren wurde durch Verwendung von Einmalgefäßen und -pipetten unter konstant keimarmen Bedingungen vorgenommen. Es ist daher unwahrscheinlich, daß unterschiedliche mikrobielle Verunreinigung zumal bei kühl gelagerten Serumproben für die unterschiedlich ausgeprägten individuellen Veränderungen der Aminosäuren verantwortlich sind. Vermutlich handelt es sich hierbei eher um Desorption einzelner Aminosäuren von Proteinen sowie um spezifische und unspezifische Proteolyse.

Ungeachtet der Ursachen für die beschriebenen Veränderungen sollte Serum für die Aminosäurenanalyse möglichst umgehend, jedoch nicht wesentlich später als vier Stunden nach Blutabnahme und unmittelbar anschließender Abtrennung zellulärer Blutbestandteile enteiweißt werden. Bis zur Proteinfällung sollte das Serum kühl gelagert werden. Unter diesen Bedingungen sind Serum und Plasmaamino-säuren miteinander vergleichbar und entsprechen offensichtlich physiologischen Werten.

Danksagung

Herrn Dr. G. Schaeffer danken wir für die freundliche Anleitung und Durchsicht der statistischen Auswertung.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

1. Schaeffer, G., Heinze, V., Jontofsohn, R., Katz, N., Rippich, Th., Schäfer, B., Südhoff, A., Zimmermann, W. & Kluthe, R. (1975), *Clin. Nephrol.* 3, 228–233.
2. Zimmermann, W., Schaeffer, G., Schäfer, B., Katz, N., Südhoff, A. & Kluthe, R. (1976), *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 5, 72–76.
3. MacFayden, D. A. (1942), *J. Biol. Chem.* 145, 387–403.
4. Christensen, H. C. & Lynch, E. L. (1946), *J. Biol. Chem.* 163, 741–751.
5. Oepen, H. & Oepen, J. (1963), *Klin. Wochenschr.* 41, 1048–1050.
6. Armstrong, M. D. & Stave, U. (1973), *Metabolism* 22, 549–560.
7. Benson, J. V., Jr., Gordon, M. J. & Patterson, J. A. (1967), *Anal. Biochem.* 18, 228–240.
8. Kedenburg, C.-P. (1971), *Anal. Biochem.* 40, 35–42.
9. Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S. (1958), *Anal. Chem.* 30, 1190–1206.
10. Held, E., Winkelmann, W., Finke, K., v. Dehn, H., Seyffart, G. & Gurland, H. J. (1974), *Klin. Wochenschr.* 52, 974–978.

M. Keck
Abteilung Innere Medizin IV
der Universität Freiburg
Wonnhalde 1–5
D-7800 Freiburg

